



⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND  
  
DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑯ Offenlegungsschrift  
⑯ DE 198 19 846 A 1

⑯ Int. Cl. 6:  
**C 07 K 16/00**  
A 61 K 39/395  
C 12 N 15/63  
// G01N 33/569,  
33/574

⑯ Aktenzeichen: 198 19 846.9  
⑯ Anmeldetag: 5. 5. 98  
⑯ Offenlegungstag: 11. 11. 99

DE 198 19 846 A 1

⑯ Anmelder:	⑯ Erfinder:
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE	Little, Melvyn, 69151 Neckargemünd, DE; Kipriyanov, Sergej, 69121 Heidelberg, DE
⑯ Vertreter:	⑯ Entgegenhaltungen:
Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea Schüßler, 81825 München	WO 91 19 739 CA 119:157915a; CA 126:130370a;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Multivalente Antikörper-Konstrukte

⑯ Die vorliegende Erfindung betrifft ein multivalentes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung Expressionsplasmide, die für ein solches F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt codieren, und ein Verfahren zur Herstellung der F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte sowie deren Verwendung.

DE 198 19 846 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft multivalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte, sie kodierende Expressionsplasmide, und ein Verfahren zur Herstellung der F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte sowie ihre Verwendung.

Natürliche Antikörper sind Dimere und werden daher als bivalent bezeichnet. Sie weisen vier variable Domänen, nämlich zwei V<sub>H</sub>- und zwei V<sub>L</sub>-Domänen, auf. Die variablen Domänen dienen als Bindungsstellen für ein Antigen, wobei eine Bindungsstelle aus einer V<sub>H</sub>- und einer V<sub>L</sub>-Domäne ausgebildet ist. Natürliche Antikörper erkennen jeweils ein Antigen, wodurch sie auch als monospezifisch bezeichnet werden. Ferner weisen sie auch konstante Domänen auf. Diese tragen zur Stabilität der natürlichen Antikörper bei. Andererseits sind sie auch für unerwünschte Immunreaktionen mitverantwortlich, die entstehen, wenn natürliche Antikörper verschiedener Tierarten wechselseitig verabreicht werden.

Zur Vermeidung solcher Immunreaktionen werden Antikörper konstruiert, denen die konstanten Domänen fehlen. Insbesondere sind dies Antikörper, die nur noch die variablen Domänen aufweisen. Solche Antikörper werden mit F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukten bezeichnet. Diese liegen häufig in Form einzelkettiger, sich miteinander geparter Monomere vor.

Es hat sich allerdings gezeigt, daß F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte nur eine geringe Stabilität aufweisen. Ihre Verwendbarkeit für therapeutische Zwecke ist daher stark eingeschränkt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zu grunde, einen Antikörper bereitzustellen, mit dem unerwünschte Immunreaktionen vermieden werden können. Ferner soll er eine Stabilität aufweisen, die ihn für therapeutische Zwecke einsetzbar macht.

Erfundungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein multivalentes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt, das eine große Stabilität aufweist. Ein solches eignet sich für diagnostische und therapeutische Zwecke.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß die Stabilität eines F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes erhöht werden kann, wenn dieses in Form eines einzelkettigen Dimères vorliegt, bei dem die vier variablen Domänen über drei Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß sich das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa 10–30 Aminosäuren aufweist. Des Weiteren hat der Anmelder erkannt, daß sich das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt mit anderen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa bis zu 10 Aminosäuren aufweist, wodurch ein multimeres, d. h. multivalentes, F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt erhalten wird. Auch hat der Anmelder erkannt, daß das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt multispezifisch sein kann.

Erfundungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein multivalentes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt herzustellen, das mindestens vier variable Domänen umfaßt, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck "F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt" weist auf einen Antikörper hin, der variable Domänen, nicht aber konstante Domänen aufweist.

Der Ausdruck "multivalentes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt" weist auf einen F<sub>v</sub>-Antikörper hin, der mehrere variable Domänen, jedoch mindestens vier aufweist. Solches wird erreicht, wenn sich das einzelkettige F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt

mit sich selbst faltet, wodurch vier variable Domänen gegeben sind, oder sich mit anderen einzelkettigen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukten zusammenfalten. In letzterem Fall liegt ein F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt vor, das 8, 12, 16, etc. variable Domänen aufweist. Günstig ist es, wenn das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt vier oder acht variable Domänen aufweist, d. h. es ist bi- oder tetravalent (vgl. Fig. 1). Ferner können die variablen Domänen gleich oder verschieden voneinander sein, wodurch das Antikörper-Konstrukt ein oder mehrere Antigene erkennt. Vorzugsweise erkennt das Antikörper-Konstrukt ein oder zwei Antigene, d. h. es ist mono- bzw. bispezifisch. Beispiele solcher Antigene sind die Proteine CD19 und CD3.

Der Ausdruck "Peptidlinker 1, 3" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Die Peptidlinker 1 und 3 können gleich oder verschieden voneinander sein. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 0–10 Aminosäuren aufweisen. In ersterem Fall ist der Peptidlinker lediglich eine Peptidbindung aus dem COOH-Rest einer der variablen Domänen und dem NH<sub>2</sub>-Rest einer anderen der variablen Domänen. Vorzugsweise weist der Peptidlinker die Aminosäuresequenz GG auf.

Der Ausdruck "Peptidlinker 2" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 3–10 Aminosäuren, insbesondere 5 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz GGPGS, aufweisen, welche erreicht wird, daß sich das einzelkettige F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt mit anderen einzelkettigen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. Des Weiteren kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 11–20 Aminosäuren, insbesondere 15–20 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet.

Erfundungsgemäßes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden, derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird. Es wird auf die Beispiele 1–5 verwiesen. Hinsichtlich der Ausdrücke "F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt" und "Peptidlinker" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Ergänzend wird auf Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, verwiesen.

DNA, die für ein erfundungsgemäßes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt kodieren, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Expressionsplasmide, die solche DNAs enthalten, auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugte Expressionsplasmide sind pDISC3 × 19-LL, pDISC3 × 19-SL, pPIC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL. Diese wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) am 30. April 1998 unter DSM 12150, DSM 12149, DSM 12152 bzw. DSM 12151 hinterlegt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend:

- (a) ein erfindungsgemäßes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt, und/oder
- (b) ein erfindungsgemäßes Expressionsplasmid, sowie
- (c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel und Kontrollen.

Von den einzelnen Komponenten können ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein multivalentes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt bereit, bei dem die variablen Domänen über Pepidolinker miteinander verbunden sind. Ein solches Antikörper-Konstrukt zeichnet sich dadurch aus, daß es keine Teile enthält, die zu unerwünschten Immunreaktionen führen können. Ferner weist es eine große Stabilität auf. Des weiteren ermöglicht es mehrere Antigene gleichzeitig zu binden. Das erfindungsgemäße F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt eignet sich daher bestens nicht nur für diagnostische, sondern auch für therapeutische Zwecke verwendet zu werden. Solche Zwecke können hinsichtlich jeder Erkrankung, insbesondere einer viralen, bakteriellen oder Tumor-Erkrankung, gesehen werden.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt die genetische Organisation eines erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes (A) und Schemata zur Bildung eines bivalenten (B) bzw. tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes (C). Ag: Antigen; His<sub>6</sub>: sechs C-terminale Histidinreste; Stop: Stopcodon (TAA); V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 2 zeigt das Schema zur Konstruktion der Plasmide pDISC3 × 19-LJ. und pDISC3 × 19-SL. c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; His<sub>6</sub>: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PeIB: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase (PeIB-Leader); rbs: Ribosomenbindungsstelle; Stop: Stopcodon (TAA); V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 3 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3 × 19-LL. 6 × His: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für β-Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>-Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pcl-B-Ladder: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 4 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3 × 19-SL. 6 × His: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für βpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGly-ProGlySer-Oligopeptid codiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 5 zeigt die Nukleotid- und die davon abgeleitete

Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3 × 19-LL kodierten bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes. c-myc-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region; Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PeIB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 6 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3 × 19-SL kodierten tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes. c-myc-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region, Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PeIB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 7 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für cinc α-Faktor-Lcadorscquenz kodiert, und einem Gen, das für das tetravalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem Pichia-Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae*-α-Faktor-Sekretionssignals; V<sub>H</sub>: variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Fig. 8 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α-Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das bivalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem Pichia-Expressionsplasmid pPIC-DISC-LL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae*-α-Faktor-Sekretionssignals; V<sub>H</sub>: variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

#### Beispiel 1

Konstruktion der Plasmide pDISC3 × 19-LL und pDISC3 × 19-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukten in Bakterien

Die Plasmide pIIOG-αCD19 und pIIOG-dmOKT3, welche für die scF<sub>v</sub>-Fragmente codieren, die von dem Hybriden HD37, das für menschliches CD19 (Kipriyanov et al., 1996, J. Immunol. Meth. 196, 51-62) spezifisch ist, bzw. von dem Hybriden OKT3, das für menschliches CD3 (Kipriyanov et al., 1997, Protein Eng. 10, 445-453) spezifisch ist, abgeleitet sind, wurde zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für ein einzelkettiges F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt verwendet. Ein PCR-Fragment 1 der V<sub>H</sub>-Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für einen Gly-Gly-Linker codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP1, 5'-TCACACAGAATTCTTAGATCTATAAGAG-55 GAGAAAATTAAACC, und DP2, 5'-AGCACACGATAT-60 CACCGCCAAGCTGGGTGTTGGC, erzeugt (vgl. Fig. 2). Das PCR-Fragment 1 wurde mit EcoRI und EcoRV gespalten und mit dem mit EcoRI/EcoRV linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pIIOG19-3 erzeugt wurde. Das PCR-Fragment 2 der V<sub>L</sub>-Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für ein c-myc-Epitop und einen Hexahistidylschwanz codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP3, 5'-AGCA-

CACAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTACCCAAAC-TCCA, und DP4, 5'-AGCACACTCTAGAGACACACA-GATCTTAGTGTGATGGTGATGGTGTGAGTTAG-G, erzeugt. Das PCR-Fragment 2 wurde mit HindIII und XbaI gespalten und mit dem durch HindIII/XbaI linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG3-19 erhalten wurde (vgl. Fig. 2). Das für das hybride scFv-3-19 codierende Gen in dem Plasmid pHOG3-19 wurde mittels PCR mit den Primern Bi3sk, 5'-CAGCCCCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG und entweder Li-1, 5'-TATA-TACTGCAGCTGCACCTGGCTACCACAC-CACCGGAGCCGCCACCCGCCTACCACGGCCGCC-AGAACCAACCACCAGCGGGCCGAGCATCAGCC-CG, zur Erzeugung eines langen flexiblen (GlyxSer)4-inter-scFv-Linkers (PCR-Fragment 3, vgl. Fig. 2) oder Li-2, 5'-TATATACTGCAGCTGCACCTGGCTACCACAC-CAGCGGCCGAGCATCAGCCCC, zur Erzeugung eines kurzen, starren GPGS-Linkers (PCR-Fragment 4, vgl. Fig. 2) amplifiziert. Die Expressionsplasmide pDISC3 × 19-LL und pDISC3 × 19-SL wurden durch Ligierung des NcoI/PvuII-Restriktionsfragments aus pHOG 19-3, umfassend das Vektorgerüst und die NcoI/PvuII-gespaltenen PCR-Fragmente 3 bzw. 4 konstruiert (vgl. Fig. 3, 4). Die vollständige Nukleotid- und Proteinsequenzen der bivalenten bzw. tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte sind in den Fig. 5 bzw. 6 angegeben.

### Beispiel 2

Konstruktion der Plasmide pPIC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukten in Hefe

#### (A) Konstruktion von pPIC-DISC-SL

Der Vektor pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) zur Expression und Sekretion von rekombinanten Proteinen in der Hefe Pichia pastoris wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Er enthält ein Gen, das für das *Saccharomyces cerevisiae* α-Faktor-Sekretionssignal codiert, gefolgt von einem Polylinker. Die Sekretion dieses Vektors beruht auf dem dominanten selektierbaren Marker, Zeocin™, der sowohl in Pichia als auch in *E. coli* bifunktionell ist. Das Gen, das für das tetravalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt (scDia-SL) codiert, wurde mittels PCR von der Matrize pDISC3 × 19-SL unter Verwendung der Primer 5'-PIC, 5'-CCGTGAATTCCAGGTGCAACTGCAG-CAGTCGGGGCTGAACACTGGC, und pSEXBN 5'-GGTCGACGTTAACCGACAAACAGATAAAACG amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit EcoRI und XbaI gespalten und in mit EcoRI/XbaI linearisiertes pPICZαA ligiert. Es wurde das Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL erhalten. Die Nukleotid- und Proteinsequenzen des tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 7 gezeigt.

#### (B) Konstruktion von pPIC-DISC-LL

Die Konstruktion von pPIC-DISC-LL wurde auf der Grundlage von pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) und pDISC3 × 19-LL (vgl. Fig. 3) durchgeführt. Die Plasmid-DNA pPICZαA wurde mit EcoRI gespalten. Die überstehenden 5'-Enden wurden unter Verwendung eines Klenow-Fragments der *E. coli*-DNA-Polymerase I aufgefüllt. Die so erhaltene DNA wurde mit XbaI gespalten, und das große Fragment, umfassend den pPIC-Vektor, wurde

isoliert. Analog wurde die DNA von pDISC3 × 19-LL mit NcoI gespalten und mit einem Klenow-Fragment behandelt. Nach der Spaltung mit XbaI wurde ein kleines Fragment, umfassend ein für den bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper kodierendes Gen, isoliert. Dessen Ligierung mit einer pPIC-abgeleiteten Vektor-DNA ergab das Plasmid pPIC-DISC-LL. Die Nukleotid- und Proteinsequenz des bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 8 gezeigt.

### Beispiel 3

Expression des tetravalenten bzw. bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes in Bakterien

- 15 E. coli-XL1-Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA), die mit den Expressionsplasmiden pDISC3 × 19-LL bzw. pDISC3 × 19-SL transformiert worden waren, wurden über Nacht in 2×YT-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 100 mM Glucose (2×YT<sub>G</sub>) bei 37°C gezüchtet. 1 : 50-Verdünnungen der Übernachtkulturen in 2×YT<sub>G</sub> wurden als Kolbenkulturen bei 37°C unter Schütteln mit 200 UpM gezüchtet. Als die Kulturen einen OD<sub>600</sub>-Wert von 0,8 erreicht hatten, wurden die Bakterien durch 10minütige Zentrifugation mit 1500 g bei 20°C pelletiert und in dem gleichen Volumen eines frischen 2×YT-Mediums, das 50 µg/ml Ampicillin und 0,4 M Saccharose enthielt, resuspendiert. IPTG wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt, und das Wachstum wurde bei Raumtemperatur (20–22°C) 18–20 h fortgesetzt. Die Zellen wurden durch 10minütige Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C geerntet. Der Kulturerüberstand wurde zurückgehalten und auf Eis gelagert. Um die löslichen periplasmatischen Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in 5% des Anfangsvolumens an eiskalter 50 mM Tris-HCl, 20% Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8,0, resuspendiert. Nach einer 1 stündigen Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Rühren wurden die Sphäroplasten mit 30.000 g 30 min bei 4°C zentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Überstand und die Sphäroplasten mit dem unlöslichen periplasmatischen Material als Pellet erhalten wurden. Der Kulturerüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden vereinigt, durch weitere Zentrifugation (30.000 g, 4°C, 40 min) geklärt. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung (Endkonzentration 70% Sättigung) eingeeignet. 30 Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (10.000 g, 4°C, 40 min) gewonnen und in 10% des Anfangsvolumens an 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0, aufgelöst. Eine immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule an chelatierender Sepharose (Pharmacia), die mit Cu<sup>2+</sup> beladen war und mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) equilibriert worden war, durchgeführt. Die Probe wurde durch ihr Leiten über die Säule aufgeladen. Sie wurde dann mit zwanzig Säulenvolumina Startpuffer, gefolgt von Startpuffer mit 50 mM Imidazol, bis die Absorption bei 280 nm des Effluenten minimal war, gewaschen (etwa dreißig Säulenvolumina). Das absorbierte Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0, eluiert. 35 Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-Farbstoffbindungstest (1976, Anal. Biochem., 72, 248–254) unter Verwendung des Bio-Rad (München, Deutschland)-Proteinassaykits bestimmt. Die Konzentrationen der gereinigten tetravalenten bzw. bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte wurden aus den A<sub>280</sub>-Werten unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten ε<sup>1mg/ml</sup> = 1,96 bzw. 1,93 bestimmt.

## Beispiel 4

Expression des tetravalenten bzw. bivalenten Antikörper-Konstruktes in der Hefe *Pichia pastoris*

Kompetente *P. pastoris* GS155-Zellen (Invitrogen) wurden in Gegenwart von 10 pg Plasmid-DNA von pPIC-DISC-LL bzw. pPIC-DISC-SL, die mit SacI linearisiert worden war, elektroporiert. Die Transformanten wurden 3 Tage bei 30°C auf YPD-Platten, die 100 µg/ml Zeocin™ enthielten, selektiert. Die Klone, die bivalente bzw. tetravale Fv-Antikörper-Konstrukte sezernierten, wurden durch Plattscreening unter Verwendung eines anti-c-myc-mAk 9E10 (IC Chemikalien, Ismaning, Deutschland) selektiert.

Zur Expression der bivalenten bzw. tetravalenten Fv-Antikörper-Konstrukte wurden die Klone in YPD-Medium in Schüttelkolben 2 Tage bei 30°C unter Röhren gezüchtet. Die Zellen wurden zentrifugiert, in dem gleichen Volumen des Mediums, das Methanol enthielt, resuspendiert und weitere 3 Tage bei 30°C unter Röhren inkubiert. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation gewonnen. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von IMAC, wie vorstehend beschrieben, isoliert.

## Beispiel 5

## Charakterisierung des tetravalenten bzw. bivalenten Fv-Antikörper-Konstruktes

## (A) Größenausschlußchromatographie

Eine analytische Gelfiltration der Fv-Antikörper-Konstrukte wurde in PBS unter Verwendung einer Superdex-200-HR10/30-Säule (Pharmacia) durchgeführt. Das Probenvolumen und die Fließgeschwindigkeit betrugen 200 µl/min bzw. 0,5 ml/min. Die Säule wurde mit hoch- und niedermolekularen Gelfiltrations-Kalibrationskits (Pharmacia) kalibriert.

## (B) Durchflußzytometrie

Die menschliche CD3+/CD19 -akute-T-Zell-Leukämien-Jurkat und die CD19+/CD3-B-Zelllinie JOK-1 wurden für die Durchflußzytometrie verwendet. 5 × 10<sup>5</sup> Zellen in 50 µl RPMI 1640-Medium (GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland), das mit 10% FCS und 0,1% Natriumazid supplementiert war (als vollständiges Medium bezeichnet), wurden mit 100 µl der Fv-Antikörper-Präparate 45 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit dem vollständigen Medium wurden die Zellen mit 100 µl 10 µg/ml anti-c-myc-Mak 9E10 (IC Chemikalien) in dem gleichen Puffer 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Waschzyklus wurden die Zellen mit 100 µl des FITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG (GIBCO BRL) unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut gewaschen und in 100 µl 1 µg/ml Propidiumiodid-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in vollständigem Medium unter Ausschluß von toten Zellen resuspendiert. Die relative Fluoreszenz der gefärbten Zellen wurde unter Verwendung eines FACScan-Durchflußzytometers (Becton Dickinson, Mountain View, CA) gemessen.

## (C) Cytotoxizitätstest

Die CD19-exprimierende Burkitt-Lymphoma-Zelllinie Raji und Namalwa wurden als Zielzellen verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (GIBCO BRL), das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (GIBCO BRL), 2 mM Glutamin und

1 mM Pyruvat supplementiert war, bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 7,5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die cytotoxischen T-Zell-Tests wurden in RPMI-1640-Medium, das mit 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat und 0,05 mM 2-ME supplementiert war, durchgeführt. Die cytotoxische Aktivität wurde unter Verwendung eines Standard-[<sup>51</sup>Cr]-Freisetzungstests bewertet; 2 × 10<sup>6</sup> Zielzellen wurden mit 200 µCi Na[<sup>51</sup>Cr]O<sub>4</sub> (Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) markiert und 4 mal gewaschen und anschließend in Medium in einer Konzentration von 2 × 10<sup>5</sup>/ml resuspendiert. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von 5 × 10<sup>6</sup>/ml eingestellt. Zunehmende Mengen an C<sub>1</sub>ILs in 100 µl wurden auf 104 Zielzellen/Vertiefung in 50 µl titriert. 50 µl Antikörper wurden jeder Vertiefung zugesetzt. Der gesamte Test wurde dreifach angelegt und 4 h bei 37°C inkubiert. 100 µl des Überstands wurden gewonnen und auf [<sup>51</sup>Cr]-Freisetzung in einem gamma-Zähler (Cobra Auto Gamma; Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) getestet. Die maximale Freisetzung wurde durch Inkubation der Zielzellen in 10% SDS bestimmt, und die spontane Freisetzung wurde durch Inkubation der Zellen in Medium allein bestimmt. Die spezifische Lyse (%) wurde berechnet als: (experimentelle Freisetzung – spontane Freisetzung)/(maximale Freisetzung – spontane Freisetzung) × 100.

## Patentansprüche

1. Multivalentes Fv-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.
2. Fv-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 1, wobei die Peptidlinker 1 und 3 0–10 Aminosäuren aufweisen.
3. Fv-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 2, wobei die Peptidlinker 1 und 3 die Aminosäuresequenz GG aufweisen.
4. Fv-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1–3, wobei das Fv-Antikörper-Konstrukt bivalent ist.
5. Fv-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4, wobei der Peptidlinker 2 11–20 Aminosäuren aufweist.
6. Fv-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4 oder 5, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> aufweist.
7. Fv-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1–3, wobei das Fv-Antikörper-Konstrukt tetravalent ist.
8. Fv-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7, wobei der Peptidlinker 2 3–10 Aminosäuren aufweist.
9. Fv-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7 oder 8, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz GGPGS aufweist.
10. Fv-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1–9, wobei das Fv-Antikörper-Konstrukt multispezifisch ist.
11. Fv-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 10, wobei das Fv-Antikörper-Konstrukt bispezifisch ist.
12. Fv-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1–9, wobei das Fv-Antikörper-Konstrukt monospezifisch ist.
13. Verfahren zur Herstellung des multivalenten Fv-Antikörper-Konstruktions nach einem der Ansprüche 1–12, wobei für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines Fv-Antikörper-Konstruktions kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird.

14. Expressionsplasmid, kodierend für das multivalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-12.
15. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3 × 19-LL. 5
16. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3 × 19-SI.
17. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-LL.
18. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-SL. 10
19. Verwendung des multivalenteren F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-12 zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen.
20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei die Erkrankungen virale, bakterielle oder Tumor-Erkrankungen sind. 15

---

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

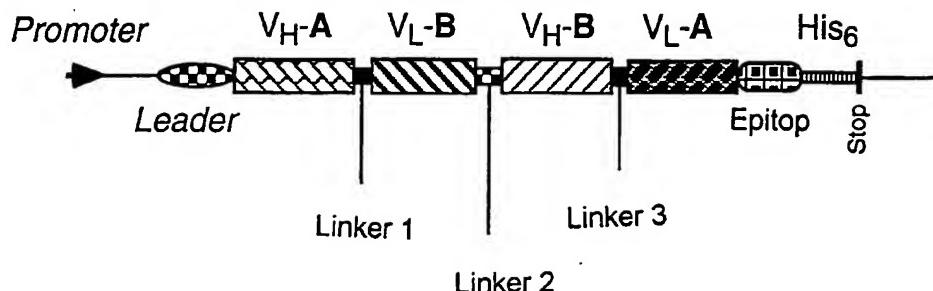
50

55

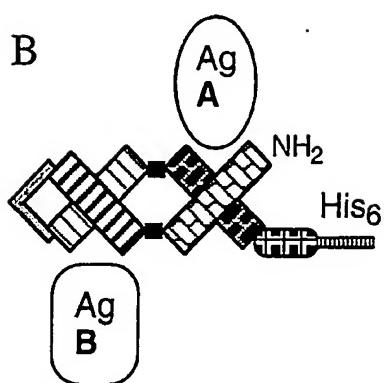
60

65

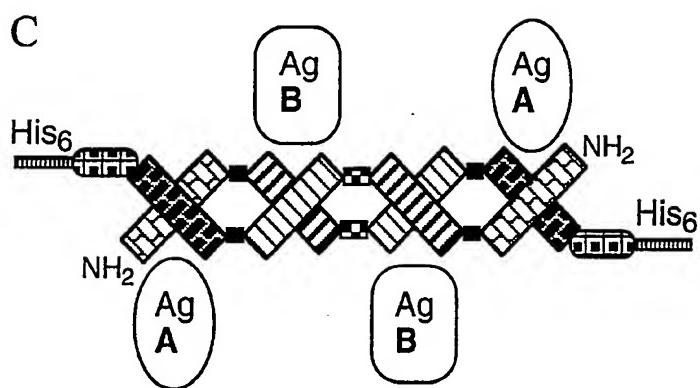
A



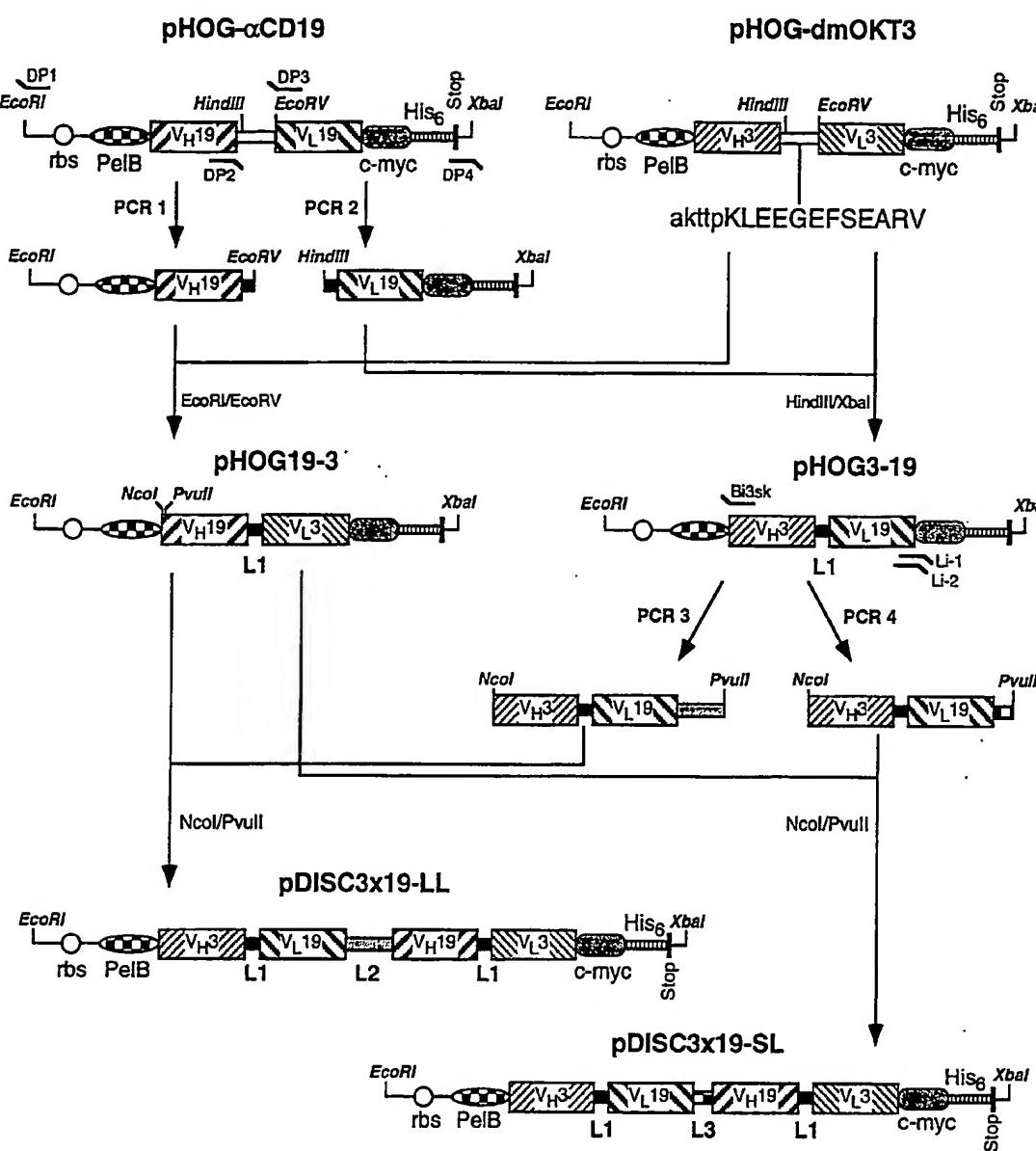
B



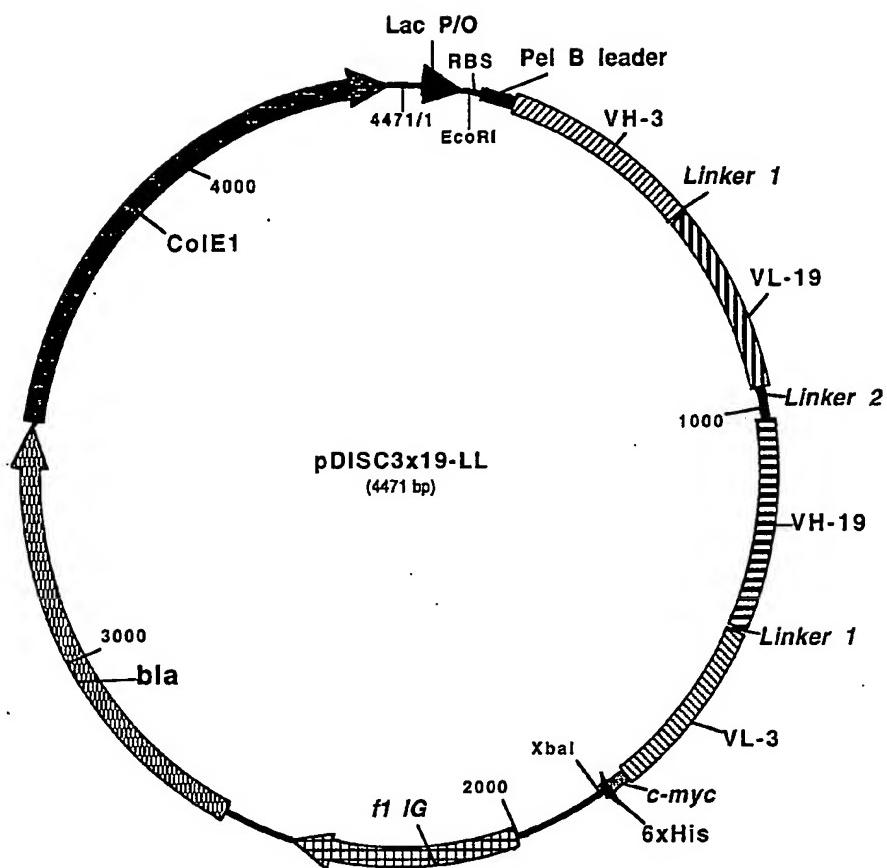
C



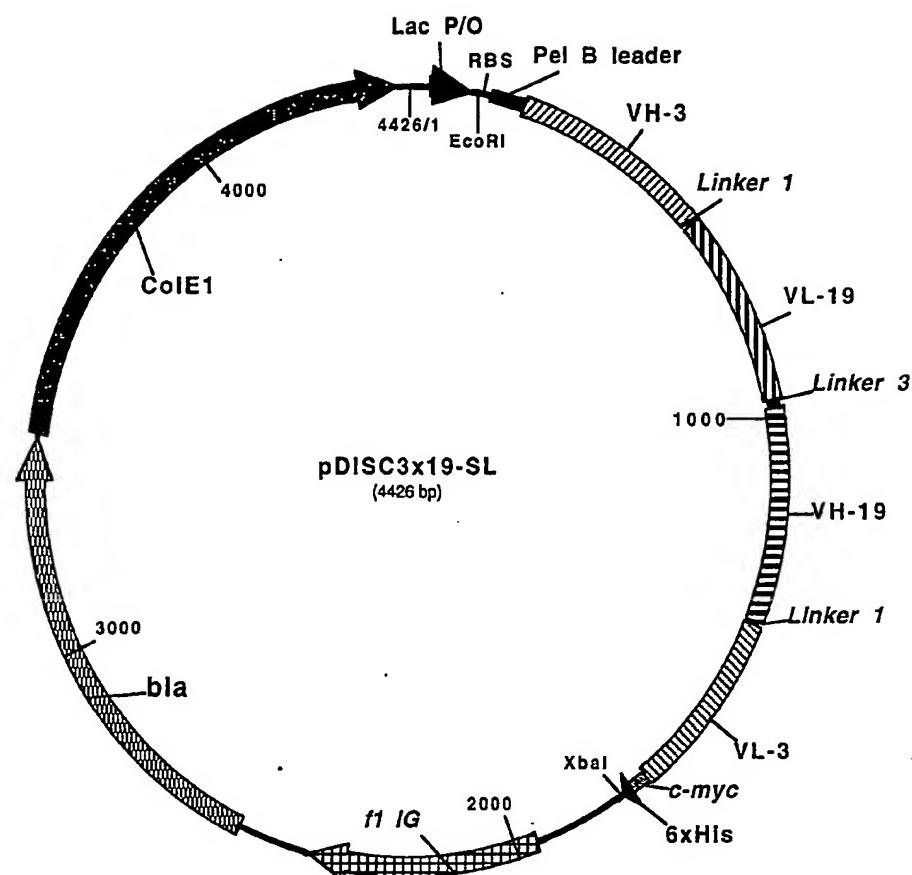
FIGUR 1



FIGUR 2



FIGUR 3



FIGUR 4

EcoRI	RBS	PelB leader	Ncol
1	GAATTCAATTAAAGAGGAGAAAATTAAACCATGAAATACCTATTGCCAACGGCAGCGCTGGCTTGCTGCTGGCAGCTCACGCCATGG		
	1> M K Y L P T A A A G L L L L A A Q P A M		
*	Frame-H1	VH anti-CD3	
92	CCGAGGTGCAACTGCAGCAGTCGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGCGCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGCTCTGGCTACACCTTTAC		
22>	A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T		
	CDR-H1	CDR-H2	
183	<u>TAGGTACACGATGCACTGGTAAACAGAGGCTGGACAGGGCTGGAAATGGATGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATAC</u>		
52>	R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T		
	Frame-H3		
267	<u>TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCTCCAGCACAGCTACATGCAACTGAGCAGCTGAC</u>		
80>	N Y N Q K F K D K A T L T D K S S S T A Y M Q L S S L T		
	CDR-H3	Frame-H4	
354	ATCTGAGGACTCTGCAGTCATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTCAGCCTTGACTACTGGGCGAACGCCACACTCTCA		
109>	S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L		
	CH1	Linker 1	VL anti-CD19
440	CAGTCTOCTCAGCCAAAACACACCCAAAGCTGGCGGTGATATCTTGCTACCCAAACTCCAGCTCTTGGCTGTGCTCTAGGGCAGA		
138>	T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q		
	CDR-L1	Frame-L2	Frame-L2
530	GGGCCACCATCTCTGCA <u>AGGCCAGCCAAGTGTGATTGATGGTGATAGTTAGTAACTGGTACCAACAGATTCCAGGAC</u>		
168>	R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L . N W Y Q Q I P G		
	CDR-L2	Frame-L3	Frame-L3
614	AGCCACCCAAACTCTCATCTATGAT <u>GATGCCAATCTAGTTCTGGGATCCCACCCAGGTTAGTGGCAGTGGGCTGGGACAGACTT</u>		
196>	Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F		
	CDR-L3	Frame-L4	
702	CACCCCTAACATCCATCTGTGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGT <u>CAGCAARAGTACTGAGGATCOGTGGACGTCGGTGG</u>		
225>	T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G		
	C kappa	NotI	Linker 2
790	GGCACCAAGCTGAAATCAAACGGCTGATGCTGGCGGCTGGTGGTGGTTCTGGCGGGCGGTGGTAGCGGGTGGGTGGCGGG		
255>	G T K L E I K R A D A A A A A G G G G S G G G G S G G G G		
	PvuII	Frame-H1	VH anti-CD19
874	<u>TCCGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCTGGCTGGAGCTGGTAGGCTCTAGTGAAGATTCTGCAAG</u>		
283>	S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K		
	CDR-H1	Frame-H2	CDR-H2
962	<u>CTCTGGCTATGCAATTAGTAGCTACTGGATGAACCTGGGTAACAGAGGCTGGACACGGGCTTGAGTGGATTGGACAGATA</u>		
312>	A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G Q I W		
	PstI	Frame-H3	
1049	<u>CTGGAGATGGTATACTAACTACAATGAAAGTTCAAGGGTAAGGCCACTCTGACTGCAGACGAATCTCCAGCACAGCTACA</u>		
341>	P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y		
	CDR-H3		
1133	TGCAACTCAGCAGCTAGCATCTGAGGACTCTGGCTCTATTCTGTGCAAGACGGGAGACTACGACGGTAGGCCGTATTACTAT		
369>	M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y		
	Frame-H4	CH1	Linker 1
1219	<u>GCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGCTCCCTCAGCCAAAACACCCAAAGCTTGGGGTGATATCGTGCTCACTC</u>		
398>	A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G D I V L T		
	VL anti-CD3	CDR-L1	
1307	AGTCTCCAGCAATCATGTCATCTCAGGGGAGAAGGTACCATGACCTG <u>CAGTGGCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGAA</u>		
427>	Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M N W		
	Frame-L2	CDR-L2	Frame-L3
1393	TACCAAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTAT <u>GACACATC</u> <u>AAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCAC</u> <u>TCAGGGCA</u>		
456>	Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F R G		
	CDR-L3		
1481	GIGGGTCTGGGACCCTTACTCTCTCACAAATCAGGGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGC <u>CAGCAGTGGAGTAGTAA</u>		
485>	S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N		
	Frame-L4	C kappa	c-myc epitope
1569	<u>CCCATTCACGTTGGCTCGGGACAAAGTTGAAATAACGGGCTGATCTGACCAACTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAG</u>		
514>	P F T F G S G T K L E I N R A D T A P T G S E Q K L I S		
	His6 tail	XbaI	
1655	<u>AAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACATCAACTAAATCTAGA</u>		
543>	E D L N S H H H H H H		

FIGUR 5

EcoRI	RBS	PelB leader	Ncol
1	<u>GAATTCA</u> AA <u>GAGGAGAA</u> TTAACCATGAA <u>AACCTT</u> ATGCTTACGGCAGCGCTGGCTTGCTGCTGCCAGCTCACGGGCGATGG		
	1> M K Y L L P T A A A G L L L A A Q P A M		
	Frame-H1	VH anti-CD3	
92	CCAGGTGCAACTGCAGCAGTCGGGCTGA <u>TGGCAAGACCTGGG</u> CTCAGTGAA <u>GATGTC</u> CTGCCAGCTCTGGCTACACCCTTAC		
22>	A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T		
	CDR-H1	CDR-H2	
183	<u>TAGGTACACGATGCA</u> CTGGTAAA <u>CAGAGG</u> CTGGACAGGGCTTGGAA <u>TGGATGG</u> A <u>TACATTA</u> ATCCTAGCCGTGGTTATAC		
52>	R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T		
	Frame-H3		
267	<u>TAATTACA</u> AT <u>CAGAAGT</u> TCAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAA <u>ATCTCCAGCACAGC</u> CTACATGCAACTGAGCACGACCTGAC		
80>	N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T		
	CDR-H3	Frame-H4	
354	ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGA <u>TATTATGATG</u> T <u>ATCATACAGC</u> CTT <u>GACTACTGGG</u> CCAAGGCCACACTCTCA		
109>	S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L		
	CH1	Linker 1	VL anti-CD19
440	CAGTCCTC <u>AGCCAA</u> ACAC <u>ACCC</u> AA <u>AGCTTGGCGG</u> T <u>ATATCTTG</u> CT <u>ACCCAA</u> ACT <u>CCAGCTTCTTG</u> CT <u>GTG</u> CT <u>CTAGGG</u> CAGA		
138>	T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q		
	CDR-L1	Frame-L2	
530	GGGCCACCAT <u>CTCTGCA</u> <u>AGGCCAG</u> CCAA <u>AGTGTG</u> T <u>ATATGATGGT</u> T <u>AGTTTGA</u> ACT <u>GGTACCA</u> ACAG <u>ATCCAGG</u> AC		
168>	R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G		
	CDR-L2	Frame-L3	
614	AGCCACCCAA <u>ACTCTC</u> AT <u>GATG</u> C <u>ATCCA</u> AT <u>CTAG</u> TT <u>CTGGG</u> AT <u>CCCACCC</u> AG <u>GGTTT</u> AG <u>TGGC</u> AG <u>TGGG</u> CT <u>GGG</u> AC <u>AGACT</u>		
196>	Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F		
	CDR-L3	Frame-L4	
702	CA <u>CCCTCAACATCC</u> AT <u>CTGTGAGA</u> AG <u>GGTGG</u> AT <u>CTGC</u> AA <u>CCCT</u> AT <u>CACTGT</u> <u>CAGC</u> <u>AA</u> <u>RG</u> T <u>ACTGAGG</u> AT <u>CO</u> <u>GTG</u> <u>ACG</u> <u>CTG</u> <u>GGT</u> <u>GG</u>		
225>	T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G		
	C kappa	NotI	Linker 3
790	GGCACCA <u>AGCTG</u> AA <u>ATCAA</u> <u>AGCC</u> <u>CTG</u> <u>ATG</u> <u>CTG</u> <u>GGG</u> <u>CG</u> <u>CT</u> <u>GGT</u> <u>GG</u> <u>CC</u> <u>AG</u> <u>GG</u> <u>TC</u> <u>GC</u> <u>AG</u> <u>GT</u> <u>GC</u> <u>AG</u> <u>CT</u> <u>CT</u> <u>GGG</u> <u>CT</u> <u>GAG</u> <u>CT</u>		
255>	G T K L E I K R A D A A A A G G P G S Q V Q L Q Q S G A E L		
	VH anti-CD19	CDR-H1	Frame-H2
879	GGTGAGG <u>CCCTGG</u> <u>CTCT</u> <u>AGTGA</u> <u>AGAT</u> <u>TTCTG</u> <u>CAAGG</u> <u>CTCT</u> <u>GGCT</u> <u>ATG</u> <u>CAT</u> <u>TCAGT</u> <u>AGC</u> <u>TACT</u> <u>GGAT</u> <u>GA</u> <u>ACT</u> <u>GGG</u> <u>GA</u> <u>AGC</u> <u>AGAG</u> <u>CC</u>		
284>	V R P G S S V K I S C K A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R		
	CDR-H2		
968	CTGGACAGGG <u>CTTG</u> <u>AGTGG</u> <u>ATGG</u> <u>ACAG</u> <u>ATT</u> <u>TG</u> <u>GG</u> <u>CT</u> <u>GG</u> <u>AG</u> <u>AT</u> <u>GG</u> <u>T</u> <u>ACT</u> <u>A</u> <u>CT</u> <u>AC</u> <u>AT</u> <u>GG</u> <u>AA</u> <u>GT</u> <u>T</u> <u>CA</u> <u>AGGG</u> <u>TA</u> <u>AGG</u> <u>CC</u>		
314>	P G Q G L E W I G Q I W P G D G D T N Y N G K F K G K A		
	Frame-H3		
1051	ACTCTGACTGCAG <u>ACGAA</u> AT <u>CTCC</u> <u>ACG</u> <u>ACG</u> <u>CT</u> <u>AC</u> <u>AT</u> <u>GCA</u> <u>ACT</u> <u>CAG</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>CT</u> <u>AG</u> <u>C</u> <u>AT</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>GG</u> <u>AC</u> <u>T</u> <u>CT</u> <u>GG</u> <u>GT</u> <u>CT</u> <u>AT</u> <u>TT</u> <u>T</u> <u>GT</u> <u>CC</u> <u>AA</u> <u>G</u> <u>AC</u>		
342>	T L T A D E S S S T A Y M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R		
	CDR-H3	Frame-H4	CH1
1142	<u>GGGAGACTACGACGGTAGGCC</u> <u>TTATT</u> <u>ACTATG</u> <u>CTATGG</u> <u>ACTACT</u> <u>GGG</u> <u>CTCAAGG</u> <u>AA</u> <u>CTCAGT</u> <u>CACG</u> <u>GTCTCC</u> <u>AGCC</u> <u>AAA</u>		
372>	R E T T T V G R Y Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S A K		
	Linker 1	Frame-L1	VL anti-CD3
1226	<u>CAACACCC</u> <u>AA</u> <u>GCTGG</u> <u>CGG</u> <u>TG</u> <u>ATAT</u> <u>CG</u> <u>TG</u> <u>CT</u> <u>ACTCAG</u> <u>TCTCAG</u> <u>CA</u> <u>ATCATG</u> <u>TCTC</u> <u>AC</u> <u>TCC</u> <u>AGGG</u> <u>GAG</u> <u>AGGT</u> <u>CACCA</u> <u>TG</u> <u>CC</u>		
400>	T T P K L G G D I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C		
	CDR-L1	Frame-L2	CDR-L2
1316	<u>GTGCCAGCT</u> <u>AA</u> <u>GTG</u> <u>TAAG</u> <u>TTAC</u> <u>ATG</u> <u>AA</u> <u>CTGG</u> <u>TAC</u> <u>ACG</u> <u>ACG</u> <u>AGTC</u> <u>AGG</u> <u>CC</u> <u>AC</u> <u>CT</u> <u>CCCC</u> <u>AA</u> <u>AG</u> <u>ATGG</u> <u>TT</u> <u>ATG</u> <u>AC</u> <u>AC</u> <u>ATCC</u> <u>AA</u>		
430>	S A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K		
	Frame-L3		
1401	<u>ACTGGCTT</u> <u>CTGG</u> <u>GAT</u> <u>CCCTG</u> <u>CT</u> <u>ACTCAGGG</u> <u>GG</u> <u>CTGGG</u> <u>AC</u> <u>CTT</u> <u>ACT</u> <u>CTC</u> <u>ACA</u> <u>ATCAG</u> <u>GGG</u> <u>CA</u> <u>TGG</u> <u>AGG</u> <u>GT</u> <u>GA</u> <u>AG</u> <u>ATG</u>		
458>	L A S G V P A H F R G S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A		
	CDR-L3	Frame-L4	C kappa
1491	TGCCACTTATTACTGCC <u>AGCAGTGGGAGT</u> AG <u>TAACCC</u> <u>ATTC</u> <u>ACG</u> <u>TG</u> <u>CTGG</u> <u>CTGGG</u> <u>ACAA</u> <u>AGTGG</u> <u>AA</u> <u>ATAA</u> <u>ACCGG</u> <u>CTG</u> <u>ATG</u> <u>ACTG</u>		
488>	A T Y Y C Q Q W S S N P P T F G S G T S K L E I N R A D T A		
	c-myc epitope	His6 tail	XbaI
1578	<u>ACCA</u> <u>ACTGG</u> <u>ATCCG</u> <u>AA</u> <u>ACAA</u> <u>AA</u> <u>AGCTG</u> <u>ATCTCAGA</u> <u>AGAAGAC</u> <u>CTAA</u> <u>CTACAT</u> <u>ACCCAT</u> <u>ACCCAT</u> <u>ACTAA</u> <u>CTAGA</u>		
517>	P T G S E Q K L I S E E D L N S H H H H H H H		

FIGUR 6

941 ATGAGATTCCTCAATTCTTACTGCTGTTTATTGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC  
 1► M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

## alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTACTCGGTTACTCAGATTAGAAGGGGATTGATG  
 25► T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

1089 TTGCTGTTTGCCATTTCACAGCACAAATAACGGGTTATIGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATGGCT  
 50► V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

## EcoRI

## XbaI

1163 GCTAAAGAAGAAGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGGCTGAACCTGAATTCAGGTGCAACTGCAGCAGTC  
 75► A K E E G V S L E K R E A E A E F Q V Q L Q Q S

VH anti-CD3  
 1234 TGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGCCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCT  
 98► G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 7

941 ATGAGATTCCTTCAATTTCCTACTGCTGTTTATTCCGAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC  
 1► M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

## alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCACTCGGTTACTCAGATTAGAAGGGGATTTCGATG  
 25► T E D E T A Q I · P A E A V I G Y S D L E G D F D

## BsrDI

1089 TTGCTGTTTGCCATTTCACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAACTACTACTATTGCCAGCATGGCT  
 50► V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

## XbaI

## EcoRI

1163 GCTAAAGAAGAAGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGGCTGAAGCTGAATTCAATGGCCAGGTGCAACTGCAG  
 75► A K E E G V S L E K R E A E A E F M A Q V Q L Q

## VH anti-CD3

1235 CAGTCTGGGGCTGAACCTGGCAAGACCTGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT  
 99► Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 8